

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUNDE~~R~~REPUBLIK DE~~U~~TSCHLAND**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D	12 AUG 1998
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mutierter OKT3-Antikörper"

am 23. Mai 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 27. Juli 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Nietiedt

Aktenzeichen: 197 21 700.1



Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
Unser Zeichen: K 2420 - hu / wd

Mutierter OKT3-Antikörper

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine
5 Verwendung.

OKT3 ist ein aus Maus stammender monoklonaler Antikörper vom IgG 2a-Typ, der ein Epitop einer ϵ -Untereinheit des menschlichen CD3-Komplexes erkennt (Kung et al., Science 206, S. 347-349 (1979); Van Wauwe et al., J. Immunol. 124, S. 2708-2713 (1980); Transy et al., Eur. J. Immunol. 19, S. 947-950 (1989)). Das Verfahren, den monoklonalen Antikörper aus dem entsprechenden Hybridom zu erhalten, ist in diesen Druckschriften im Detail beschrieben. Außerdem wurde die OKT3 produzierende Hybridomazelllinie am 26. April 1979 unter der ATCC-Nummer CRL 8001 bei der American Type Culture Collection, 12301
15 Parklawn Drive, Rockville, MD, 200852 von der Inhaberin des EP-Patents 0 018 795 hinterlegt. OKT3 wird seit langem benutzt, um eine T-Zellantwort zu unterdrücken und dadurch die Abstoßung von Transplantaten zu verhindern (Thistlethwaite et al., Transplantation 38, S. 695-701 (1984); Woodle et al., Transplantation 51, S. 1207-1212 (1991)). Andererseits kann durch OKT3 auch eine T-Zell-Aktivierung und Proliferation ausgelöst werden, die Effektorzellen anregt, was bei der adoptiven Krebs-Immuntherapie eingesetzt werden kann (Yannelli et al., J. Immunol. Meth. 1, S. 91-100 (1990)). OKT3 wurde sowohl alleine als auch als Komponente eines bispezifischen Antikörpers eingesetzt, um cytotoxische T-Lymphozyten gegen Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen zu richten
25 (Nitta et al., Lancet 335, S. 368-376 (1990); Sanna et al., Bio/Technology 13, S. 1221-1224 (1995)). Außerdem sind auch humanisierte Versionen des OKT3-monoklonalen Antikörpers, die in COS-Zellen exprimiert wurden, bekannt (Woodle et al., J. Immunol. 148, S. 2756-2763 (1992); Adair et al., Human. Antibod. Hybridomas, S. 41-47 (1994)). Bisher bestand aber das Problem, daß OKT3
30 keine ausreichende Stabilität aufweist und insbesondere sich nicht in bekannten

rekombinanten Expressionssystemen stabil und in genügender Menge exprimieren läßt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, OKT3 rekombinant zu exprimieren und einen Antikörper zu erhalten, der eine befriedigende Stabilität aufweist.

Die Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

10 Von den Erfindern wurde gefunden, daß durch Einbringen einer Punktmutation an Position H100A der Aminosäuresequenz von OKT3 die Stabilität um ein Vielfaches zunimmt. Diese Punktmutation betrifft den Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure, bevorzugt Serin, in der Aminosäuresequenz von OKT3.

15 Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers wird von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 ausgegangen. Die cDNA wird nach den dem Fachmann bekannten Methoden, die beispielsweise in Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994) beschrieben wurden, hergestellt. Die 20 für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA kann mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer, z.B. mittels der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der κ -Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der κ -Kette hybridisieren, hergestellt werden (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die 25 variable Domäne der schweren Kette codiert, können beispielsweise der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der γ -Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114 (1995), verwendet werden.

30 Die amplifizierte DNA wird danach in einen für die Sequenzierung und für "site-specific mutagenesis" geeigneten Vektor, wie er dem Fachmann bestens be-

kannt sind, inseriert. Beispielsweise kann der von der Firma Stratagene vertriebene Vektor pCR-Skript SK(+) verwendet werden. Mutationen werden in der von OKT3 stammenden ν_H -Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht. Die dafür notwendigen Bedingungen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise auch in Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987) beschrieben. Die Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein) wird geeigneterweise unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt, falls ein Austausch gegen Serin an dieser Position ausgeführt werden soll.

Die so veränderte DNA kann danach in einen Vektor bzw. Expressionsvektor kloniert werden. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors sind dies pGEMEX, pUC-Derivate oder pET3b. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad 1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugegeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-1. Die Expression in E. coli ist erfindungsgemäß bevorzugt, wofür vorzugsweise der in Fig.1 gezeigte Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996) eingesetzt wird, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als Ncol/BamHI DNA-Fragment insertiert ist. Es kommt zur Expression eines an der Position 100 A (Kabat-Nummerierungssystem) mutierten einzelkettigen Antikörpers OKT3, der die in Fig. 2 gezeigte Sequenz aufweist.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E. coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BI21 und SG 13009, den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und Hela sowie die Insektenzellen sf9. Bevorzugt ist die Verwendung der von der Firma Stratagene vertriebenen XL1-Blue E. coli-Zellen.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine DNA in einen Expressionsvektor

inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden inseriert werden kann, so daß die DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann, beispielsweise in Form eines His-Fusionsproteins. Die dafür notwendige Information ist im vorzugsweise verwendeten Plasmid pHOG21 enthalten. Weiter kann die mutierte Form von OKT3 in Form eines bispezifischen Antikörpers, z.B. in Verbindung mit einem Antikörper gegen menschlichen CD19-Komplex vorliegen. Die Sequenz eines solchen bispezifischen Antikörpers ist in Fig. 3 gezeigt.

Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie mittels rekombinanter Methoden in ausreichender Menge hergestellt werden können und eine im Vergleich zum unmutierten monoklonalen Antikörper OKT3 größere Stabilität aufweist. Diese äußert sich beispielsweise darin, daß der mutierte Antikörper auch noch nach einem Monat Lagerung bei 4°C in PBS kaum von seiner ursprünglichen Bindungsaffinität eingebüßt hat, wohingegen OKT3 unter diesen Bedingungen bereits deutlich an Bindungsaffinität verloren hat (46%). Außerdem hat der erfindungsgemäße Antikörper den Vorteil, daß er als Einzelkettenantikörper (scFv) eine schnellere Blut-Clearance und eine bessere Tumorpenetration aufweist. Weiter sind ScFv's sehr nützliche Moleküle, um Arzneistoffe, Toxine oder Radionuklide an Tumorstellen zu bringen, was in der Tumordiagnostik und -therapie wichtig ist.

Die vorliegende Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben.

Fig. 1: Plasmid pHOG21

wobei die verwendeten Abkürzungen folgende Bedeutungen haben:

Ap^R: Ampicillin-Resistenzgen

c-myc: Sequenz codierend für ein Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper 9E10 (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, Großbritannien) erkannt wird

ColE1: Ursprung der DNA-Replikation

- 5 -

fI IG: Intergene Region des fI-Phagen

His₆: Sequenz codierend für 6 Histidinreste

linker: Sequenz codierend für 17 Aminosäuren, die die
v_H- und v_L-Domäne verbindet

pelB: Signalpeptidsequenz für bakterielle Pektatlyase

P/O: Wildtyp-Lac-Promotor/Operator

Fig. 2: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des mutierten OKT3-Einzelkettenantikörpers

10 durchgehende Linie: Start-Aminosäure (davor Leader-Sequenz)
gestrichelte Linie: Aminosäurenaustausch Cys ---> Ser

15 Fig. 3: Bispezifischer Antikörper zusammengesetzt aus mutiertem OKT3
und anti-CD19

Die Erfindung wird weiter anhand des Beispiels erläutert.

BEISPIEL 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Die Isoloation von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 und die cDNA-Synthese wurde, wie in "Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994)" beschrieben durchgeführt. Die für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der κ -Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der κ -Kette hybridisieren, hergestellt (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die variable Domäne der schweren Kette codiert, wurde der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der γ -Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114

(1995), verwendet. Das 50 μ l Reaktionsgemisch enthielt 10 pmol jedes Primers und 50 ng Hybridoma cDNA, 100 μ M jedes der dNTPs, 1x Vent-Puffer (Boehringer Mannheim), 5 μ g BSA und 1 U Vent DNA-Polymerase. Es wurden 30 Zyklen je 1 Minute bei 95°C, 1 Min. bei 55°C und 2 Minuten bei 75°C in einem PCR-Thermozykler durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde mit einem QIAquick PCR-Reinigungskit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

Die amplifizierte DNA wurde danach in den von der Firma Stratagene vertriebenen Vektor pCR-Skript SK(+), der mit dem Restriktionsenzym SrfI geschnitten worden war, "blunt-end" ligiert. Mutationen wurden in der von OKT3 stammenden ν_H -Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht (Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987)). Die Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein gegen Serin) wurde unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGT-
CAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt.

Für die Expression der erhaltenen mutierten DNA wurde der in Fig.1 gezeigte Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996) eingesetzt, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als Ncol/BamHI DNA-Fragment inseriert ist. XL1-Blue E. coli-Zellen (Stratagene) wurden mit diesem Expressionsvektor transformiert und über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT_{GA}) bei 37°C wachsen gelassen. Verdünnungen (1:50) der Übernachtkulturen in 2xYT_{GA} wurden bei 37°C unter Schütteln bei 37°C wachsen gelassen. Sobald die Kulturen OD₆₀₀ = 0,8 erreichten, wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 1500 g für 10 Minuten und 20°C pelletiert und im gleichen Volumen frischem 2xYT-Medium enthaltend 50 μ g/ml Ampicillin und 0,4 M Sucrose resuspendiert. Es wurde IPTG auf eine Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt und das Wachstum bei Raumtemperatur für 20 Std. fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000g für 10 Minuten und 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde auf Eis aufbewahrt. Um lösliche periplasmatische Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in eiskaltem 50 mM Tris-HCl, 20% Sucrose, 1 mM EDTA, pH 8,0 (5%

des Ursprungsvolumens) aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Rühren wurden Spherozlasten bei 30000 g für 30 Minuten und 4°C abzentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Spherozlasten plus unlösliches periplasmatisches Material als Pellet anfielen. Der vorstehend auf Eis aufbewahrte Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden kombiniert und durch eine zusätzliche Zentrifugation (30000 g, 4°C, 40 Min.) geklärt. Nach Filtrationen durch Glasfilter mit einer Porengröße von 10-16 μm und dann 0,2 μm wurde das Volumen 10-fach durch Konzentration mit Amicon YM10 Membranen (Amicon, Witten). Der konzentrierte Überstand wurde durch Zentrifugation geklärt und gegen 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 bei 4°C dialysiert. Immobilisierte Metall-Affinitätschromatografie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule von chelatisierender Sepharose (Pharmacia) beladen mit Ni^{2+} und equilibriert mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) durchgeführt. Auf der Säule adsorbiertes Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0 eluiert. Nach Pufferwechsel zu 50 mM MES, pH 6,0 wurde das Protein weiter auf einer Mono S Ionenaustauschsäule (Pharmacia) gereinigt. Der erfindungsgemäße gereinigte scFv-Antikörper wurde in PBS (15 mM Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,4) dialysiert. Für einen längere Aufbewahrung wurde der Antikörper in Anwesenheit von BSA (Endkonzentration 10 mg/ml) eingefroren und bei -80°C gelagert.

Patentansprüche

5

1) Monoklonaler Antikörper gekennzeichnet durch einen Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure an Position H100A des unter der Bezeichnung bekannten Antikörpers OKT3.

10 2) Monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß die polare Aminosäure Serin ist.

3) Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieser die in Fig. 2 angegebene Sequenz aufweist.

15 4) Verfahren zur Herstellung des monoklonaler Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

20 a) Gewinnen von mRNA aus frisch subklonierte Hybridomazellen von OKT3 und Umschreibung zu cDNA

b) Amplifikation der für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kodierenden DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer,

25 c) Klonierung der unter b) erhaltenen DNA in einen zur gerichteten Mutagenese geeigneten Vektor sowie Einführung der gewünschten Mutation unter Verwendung geeigneter Primer,

30 d) Insertion der unter c) erhaltenen mutierten DNA in einem Expressionsvektor und Expression in einem geeigneten Expressionssystem.

- 5) Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt b) verwendeten Primer Bi5, Bi8, Bi4 und Bi3f sind.
- 6) Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei der in Schritt c) verwendete Vektor pCR-Skript SK(+) ist.
- 7) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei in Schritt c) der Primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC verwendet wird.
- 10 8) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei der in Schritt d) verwendete Expressionsvektor pHOG21 ist.
- 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Expression in XL1-Blue E. coli-Zellen erfolgt.
- 15 10) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verminderung oder Ausschaltung einer Transplantatabstoßung durch einen Organtransplantatempfänger.
- 20 11) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in der Tumordiagnostik oder -therapie.

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung.

Fig. 1

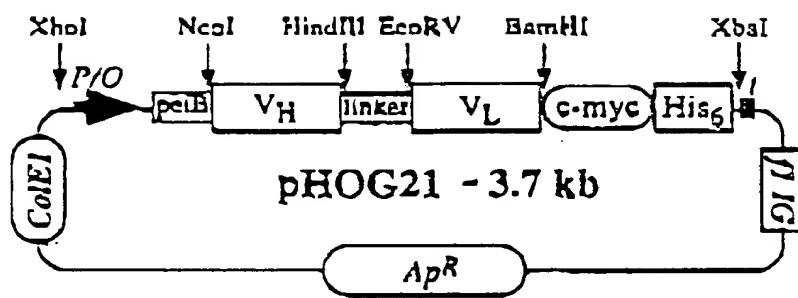


Fig. 2

EcoRI	PBS	PstI leader
1 GAATTCAATTAAAGAGGA		
1 GAAATTCAATTAAAGAGGA	GAAATTAAACCATGAAATACCTATTGCCAACGGCAGCCGCTGGCTGCTGCTGGCACT	
	1 MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuAlaAla	
Ncol	WH anti-CD3	Frame-H1
79 CAGCCGGCCATGGCCACGTGCAGCTGCAGCAGTCGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTC		
18 ▶ GlnProAlaMetAlaGlnValGlnLeuGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSer		
	CDR-H1	Frame-H2
	TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACCGATGCACTGGTAAACAGAGGCCCTGGACAGGGCTGGAA	
	CysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrArgTyrThrMetHisTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGlu	
	CDR-H2	
232 TGGATTGGATACTTAAATCCTAGCCGTGGTTACTAAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAGGCCACA		
69 ▶ TrpIleGlyTyrIleAsnProSerArgGlyTyrThrAsnTyrAsnGlnLysPheLysAspLysAlaThr		
	Frame-H3	
301 TTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCACTCTATTAC		
92 ▶ LeuThrThrAspLysSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyr		
	CDR-H3	Frame-H4
379 TGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCCTTGACTACTGGGCCAACGCCACACTCTCACAGTCCTCAG		
118 ▶ CysAlaArgTyrTyrAspAspHisTyrSerLeuAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrLeuThrValSerSerA		
CH1	Linker	VL anti-CD19
432 CCAAAACAAACACCCAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAACTCCAGCTTCTGGCTGIGTCTCTAGGCCAG		Frame-L1
142 ▶ IaLysThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleLeuLeuThrGlnThrProAlaSerLeuAlaValSerLeuGlyGln		
	CDR-L1	
529 AGGGCCACCACTCTCTGCAAGGCCACCCAAAGTGTGTTATTATGATGGTCAAGTTATTGAACTGGTAC		
168 ▶ ArgAlaThrIleSerCysLysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrLeuAsnTrpTyrG		
Frame-L2		
AACAGATTCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCCATCCAAATCTAGTTCTGGCATCCCCACCCAGG		CDR-L2
1ngIleProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrAspAlaSerAsnLeuValSerGlyIleProProArg		Frame-L3
TTTAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTCACCCCTAACATCCATCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCAC		
246 ▶ PheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuAsnIleHisProValGluLysValAspAlaAlaThrTyrHis		
CDR-L3	Frame-L4	
731 TGTCAGCAAAAGTACTGAGGATCCCTGGACGTTGGTGGAGGCACCAAGCTGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCG		C kappa NotI
242 ▶ CysGlnGlnSerThrGluAspProTrpThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAspAlaAla		
o-myc epitope		His6 tail
826 GCCGCTGGATCCGAAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAAAGAT		BgIII
267 ▶ AlaAlaGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHis... HisHisHisHisHis...		

Diabody of anti-CD19 and anti-CD3 (mutated OKT3)

EcoRI RBS PeI B leader
 1 GAATTCACTAAAGAGGGAGAAATTAAACCATGAAATACCTATTGCCCTACGGCAGCCCTGGCTGGCTGGCAGCT
 1► MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuLeuAlaAla
 NcoI + VH anti-CD3 Frame-H1
 79 CAGCCGCCATGGCGCAGGTGCAGTCAGTCAGCTGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCCTACTGAAGATGTCC
 18► GlnProAlaMetAlaGlnValGlnLeuGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSer
 157 TCCAAGCCTCTGGCTACACCTTACTAGGTACACGATGCACTGGTAAAACAGACCTGGACAGGGCTGGAA
 14► CysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrArgTyrThrMetHisTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGlu
 CDR-H1 Frame-H2
 232 TGGATTGGATACTTAACTCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAGGCCAG
 69► TrpIleGlyTyrIleAsnProSerArgGlyTyrThrAsnTyrAsnGlnLysPheLysAspLysAlaThr
 Frame-H3
 301 TTGACTACAGACAAATCTCCAGCACAGCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCATTAC
 92► LeuThrThrAspLysSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyr
 CDR-H3 Frame-H4
 379 TGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCAAGGCACCACTTCACAGTCCTCAG
 116► CysAlaArgTyrTyrAspAspHisTyrSerLeuAspTyrTrpGlyGlnGlyLeuThrValSerSerA
 CH1 Linker VL anti-CD19 Frame-L1
 452 CCAAAACAAACACCCAAAGCTTGGGGTGTATCTTGCACCCAAACTCCAGCTCTGGCTGGCTGAGCTAACCCAG
 142► IaLysThrThrProLysLeuGlyAspIleLeuLeuThrGlnThrProAlaSerLeuAlaValSerLeuGlyGln
 CDR-L1
 529 AGGGCCACCATCTCTGCAAGGCCACCCAAAGTGTGATTATGATGGTAGTTATTGAACTGGTACC
 168► ArgAlaThrIleSerCysLysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrLeuAsnTrpTyrG
 Frame-L2
 19 AACAGATTCCAGGACAGCCACCCAAACTCCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTCTGGGATCCCACCCAGG
 71► IaGlnIleProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrAspAlaSerAsnLeuValSerGlyIleProProArg
 673 TTAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTTCACCCCAACATCCATCTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCAC
 216► PheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuAsnIleHisProValGluLysValAspAlaAlaThrTyrHis
 CDR-L3 Frame-L4
 751 TGTCAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTGGTGGAGGGACCAAGCTGGAAATCAAQGGGCTGATGCTGG
 242► CysGlnGlnSerThrGluAspProTrpThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAspAlaAla
c-myc epitope His6 tail BgIII
 826 GCGCTGGATCCGAAACAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAACTCACATCACCATCACATCAAAAGAT
 267► AlaAlaGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHis...
 RBS PeI B leader
 899 CTATTAAAGAGGGAGAAATTAAACCATGAAATACCTATTGCCCTACGGCAGCCCTGGCTGCTGGCAGCTCAGC
 1► MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuLeuAlaAlaGlnP
 NcoI + VH anti-CD19 Frame-H1
 977 CGGCCATGGCGCAGGTGCAGTCAGCAGCTGGGCTGAGCTGGCTGGGCTGGCTCAGTGAAGATTCCTGCA
 19► IcAlaMetAlaGlnValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuValArgProGlySerSerValLysIleSerCysL
 CDR-H1 Frame-H2
 1055 AGGCTTCCTGGCTATGCATTCACTAGCTACTGCGATGAACTCCGTGAAGCAGAGCCCTGGACAGGGCTTGAGTGG
 45► ysAlaSerGlyTyrAlaPheSerSerTyrTrpMetAsnTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGluTrpI
 CDR-H2
 1130 TTGGACAGATTTGGCCTGGAGATGGTGTACTAACTACAATGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGA
 70► IeGlyGlnIleTrpProGlyAspGlyAspThrAsnTyrAsnGlyLysPheLysGlyLysAlaThrLeuT
 Frame-H3
 9 CTGGCACACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCACGACCCATGACATCTGAGGACTCTGGCGTCTATTCTGTG
 53► IxAlaAspGluSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeuSerSerLeuAlaSerGluAspSerAlaValTyrPheCysA
 CDR-H3 Frame-H4
 1277 CAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCAAGGAACCTCAGT
 119► IaArgArgGluThrThrValGlyArgTyrTyrAlaMetAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerVa
 CH1 Linker VL anti-CD3 Frame-L1
 1347 CACCGTCTCTCAGCCAAACACACCCAAAGCTGGGGTGTATCTGACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCIG
 142► IThrValSerSerAlaIaLysThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleValLeuThrGlnSerProAlaIleMetSerA
 CDR-L1 Frame-L2
 1424 CATCTCCAGGGGAGAAGGTGACCATGACCTGGCACTGCGCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACCTGGTACCCAGCA
 168► IaSerProGlyGluLysValThrMetThrCysSerAlaSerSerValSerTyrMetAsnTrpTyrGlnG
 CDR-L2 Frame-L3
 1497 GAACTCAGGCCACCTCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCCTGGAGTCCCTGCTCACTTCA
 192► IxLysSerGlyThrSerProLysArgTrpIleTyrAspThrSerLysLeuAlaSerGlyValProAlaHisPheA
 1571 GGGGCAGTGGGCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCCGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCG
 217► rgGlySerGlySerGlyThrSerTyrSerLeuThrIleSerGlyMetGluAlaGluAspAlaAlaThrTyrTyrCysG
 CDR-L3 Frame-L4
 1649 AGCACTGGAGTAGTAACTCATTCACTGGCTGGGACAAAGTGGAAATAAACCGGGCTGATACCTGACC
 243► IaGlnTrpSerSerAsnProPheThrPheGlyGlyThrLysLeuGluIleAsnArgAlaAspThrAlaPr
c-myc epitope His6 tail XbaI
 1722 AACTGGATCCGAAACAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACACTAACTGAGA
 267► oThrGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHis...